

**SEKUEN ASAM AMINO ANTI *WHITE SPOT SYNDROME VIRUS* (WSSV)
PADA UDANG WINDU (*PENAEUS MONODON*)**Supriatna, I.,¹ Yustiati, A.² dan Iskandar²¹ Dosen Akademi Perikanan Sorong KKP, Mahasiswa Program Pasca Sarjana Universitas Padjadjaran² Dosen FPIK Universitas Padjadjaran

E-mail: imansupriatna78@yahoo.com

ABSTRACT

This study aimed to determine the amino acid sequence homology, functional domains, the model prediction of protein structure and characteristics of genes encoding anti WSSV in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) originated from Indramayu District. The research method was qualitative descriptive analysis by comparing the results of PCR isolation of genes encoding anti WSSV with GenBank sequence data. The results showed that the sequence gene encoding anti WSSV in black tiger shrimp DNA originated Indramayu gene sequences homologous with *Penaeus monodon AV gene*, complete cds (no. Accession DQ641258.1) and *Penaeus monodon PMAV (PmAV) mRNA*, complete cds (no. Accession AY3202750.1). C -type lectin is a functional domain of the amino acid sequences of anti WSSV in black tiger shrimp. The structure of the protein encoding anti WSSV (c -type lectin) is characterized by the presence of a signal peptide, alpha helix clusters, beta strand and there are in three cells zones. C-type lectin indicated could help improved the resistance of black tiger shrimp from Indramayu district against WSSV and the c -type lectin could be found in various types of organisms to be developed as an immunostimulatory substance.

Key words: Amino acid sequence, anti WSSV, c-type lectin, black tiger shrimp, immunostimulatory

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan urutan homologi asam amino, domain fungsional, prediksi model struktur protein dan karakteristik gen penyandi anti WSSV dalam udang windu (*Penaeus monodon*) berasal dari Kabupaten Indramayu. Metode penelitian adalah kualitatif analisis deskriptif dengan membandingkan hasil PCR isolasi gen penyandi anti WSSV dengan urutan data GenBank. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gen urutan pengkodean anti WSSV dalam DNA udang windu berasal gen Indramayu sekuens homolog dengan *Penaeus monodon* gen AV, cd complete (no. Akses DQ641258.1) dan *Penaeus monodon PMAV (PmAV) mRNA*, cd lengkap (no. Akses AY3202750.1). C-type lectin adalah domain fungsional dari urutan asam amino anti WSSV pada udang windu. Struktur protein pengkodean anti WSSV (c-type lectin) ditandai dengan adanya sinyal peptida, cluster alpha helix, beta untai dan ada dalam tiga zona sel. Tipe C lektin menunjukkan bisa membantu meningkatkan ketahanan udang windu dari kabupaten Indramayu terhadap WSSV dan c-jenis lektin dapat ditemukan dalam berbagai jenis organisme untuk dikembangkan sebagai zat imunostimulan.

Kata kunci: Urutan asam amino, anti WSSV, c-jenis lektin, udang windu, imunostimulan

PENDAHULUAN

Udang adalah salah satu komoditas perikanan yang masih menjadi primadona ekspor dan mempunyai peluang pasar cukup terbuka. Kementerian Kelautan dan Perikanan melalui Ditjen Perikanan Budidaya telah menargetkan produksi udang tahun 2013 sebesar 608.000 ton, naik 30% dari realisasi tahun 2012 sebesar 457.600 ton (KKP, 2013).

Serangan patogen merupakan masalah yang cukup sulit untuk ditanggulangi terutama yang disebabkan oleh virus, karena pada umumnya dapat menyebabkan kematian massal dalam waktu yang relatif singkat (Montet, 2009). Jenis virus yang menginfeksi udang dan dapat menyebabkan kematian massal antara lain *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) pada tahun 1992-2002 (Flegel *et al.*, 2008).

WSSV dapat teridentifikasi secara cepat dan tepat pada berbagai stadia udang baik dari alam ataupun udang dari lokasi budidaya dengan menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Hal yang sama juga dapat dilakukan dalam mengidentifikasi gen antivirus yang terdapat pada sistem kekebalan udang sebagaimana yang dilaporkan oleh Luo *et al.*, (2003) yang pertama kali mengidentifikasi keberadaan gen *Penaeus monodon Anti Viral* (PmAV) pada udang windu. Gen anti WSSV dapat diidentifikasi melalui teknik PCR dengan menggunakan primer khusus anti WSSV (Parenrengi *et al.*, 2009).

Yeh *et al.*, (2009) telah menyelidiki perubahan imunologi pada udang *Litopenaeus vannamei* yang terinfeksi WSSV dan IHHNV yang terdeteksi oleh PCR. Menurut Arts (2006) respon imun untuk antibakteri dan anti-jamur pada krustasea memiliki kesamaan dengan kelompok insekta, sedangkan respon imun untuk antivirus masih perlu kajian lebih lanjut.

Imunostimulan merupakan salah satu alternatif yang aman dan murah untuk mengatasi patogen yang disebabkan oleh virus. Imunostimulan biasanya berasal dari nukleotida polipeptida atau polisakarida seperti senyawa fucoidan hasil ekstraksi dari *Sargassum polycystum* yang dapat mengurangi serangan WSSV pada *Penaeus monodon* (Chotigeat *et al.*, 2004). Nukleotida polipeptida maupun polisakarida merupakan gugus protein yang dibentuk dari beragam polimer asam amino. Salah satu fungsi asam amino yang merupakan molekul penting dalam tubuh organisme adalah sebagai sistem pertahanan dan resistensi organisme terhadap patogen (Calder, 2006). Informasi sekuen asam amino antiviral dari hasil translasi sekuensing produk PCR beserta primer khusus anti WSSV sangat penting sebagai dasar dalam mempelajari lebih lanjut hubungan sekuen dan

jenis asam amino yang membentuk domain fungsional sebagai anti WSSV dalam upaya meningkatkan resistensi udang terhadap patogen.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui homolog, domain fungsional dan karakteristik sekuen gen penyandi anti WSSV pada udang windu (*P. monodon*).

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan selama enam bulan pada bulan Mei-Oktobre tahun 2013 di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Padjadjaran.

Bahan-bahan yang digunakan dalam isolasi dengan menggunakan Kit Promega (*Wizard Genomic DNA Purification Kit*). Bahan-bahan yang digunakan dalam amplifikasi dengan PCR terdiri dari *Promega Go Taq® Green Master Mix* yang berisi Taq DNA Polymerase, dNTP, buffer, Mg²⁺, Plasmid (+) standar sebagai kontrol positif WSSV, *Nuclease Free Water* (NFW), Primer WSSV 146F dan 146R, Primer antiviral (PmAV) dan DNA *template*.

Metode penelitian yang digunakan adalah metode survei dengan analisis deskriptif kualitatif yaitu dengan membandingkan hasil PCR isolasi gen penyandi anti WSSV dengan sekuen dari data GenBank.

Prosedur Penelitian

1. Pengambilan Sampel

Sampel udang untuk isolat DNA diambil dari sentra perikanan tambak Kabupaten Indramayu di daerah Cantigi dan Karangsong.



Gambar 1. Sampel udang *P. monodon* dewasa dan *P. monodon* post larva (PL) 20

Sampel udang yang didapat di daerah Cantigi terdiri dari tiga ekor benur udang windu (PL) 25. Adapun di Karangsong terdiri dari 1000 benur udang windu (PL) 20 dan dua ekor udang windu dewasa berukuran 200 gram. Masing-masing sampel udang diberi kode yaitu udang windu (PL) asal Cantigi (W1), benur udang windu (PL) asal Karangsong (W2), udang windu dewasa asal Karangsong (W3). Semua sampel dimasukkan dalam larutan preservasi dan disimpan dalam freezer minus 20°C, kecuali sampel dari Karangsong yang dibawa dalam keadaan masih hidup.

2. Isolasi DNA Udang

Teknik isolasi DNA udang menggunakan *Kit Wizard Genomic DNA Purification* (Promega). Prosedur isolasi DNA udang yaitu pertama dengan mengambil

sampel udang dari botol sampel dan meletakkannya di atas petridish, kemudian serap dengan tissue untuk mengurangi larutan preservasi sampel. Khusus untuk post larva udang, semua bagian tubuhnya diperlukan untuk sampel isolasi dan segera dimasukkan ke dalam mikrotube 1,5 mL. Udang yang berukuran lebih dari 4 cm panjangnya (umur 1,5 bulan), jaringan tubuh yang diambil cukup dari insang dengan membuka karapas bagian kepala dan mencabut insang dengan pinset steril) atau kaki renang (dengan memotong kaki renang memakai gunting steril) dari udang sebagai sampel. Ditambahkan 120 µl EDTA 0,5 M (pH 8.0) dan 500 µl *Nuclei Lysis Solution* ke dalam mikrotube 1,5 ml yang berisi sampel jaringan udang dan segera digerus-gerus dengan sumpit plastik steril hingga lembut di atas es curai dalam kotak styrofoam. Selanjutnya ditambahkan ke dalam mikrotube tersebut 17,5 µl *Proteinase K* (20 mg/mL). Sampel (disisipkan dalam lembaran gabus tipis) dipindahkan ke *waterbath* untuk diinkubasi selama 30 menit pada suhu 65°C. Kemudian ditambahkan 3 µl *RNase Solution* ke mikrotube dan dicampur dengan sampel jaringan dengan cara membolak-balikkan tube 2-5 kali. Selanjutnya diinkubasi kembali selama 5 menit pada suhu 37°C dan kemudian sampel didinginkan pada suhu kamar selama 5 menit. Dalam kondisi suhu kamar, sampel ditambahkan 200 µL *Protein Precipitation Solution* dan di vortex mixer selama 20 detik pada kecepatan tinggi. Kemudian sampel didinginkan di atas es selama 5 menit. Sampel disentrifugasi selama 4 menit pada 13.000 rpm. Protein yang dipresipasikan akan membentuk lapisan pelet putih (DNA udang) di bagian bawah tube. Dengan hati-hati diambil supernatan yang mengandung DNA dengan mikropipet dan dipindahkan ke dalam mikrotube 1,5 mL baru yang telah diisi 600 µL isopropanol. Selanjutnya campurkan sampel dengan cara membolak-balikkan tube beberapa kali dan segera disentrifugasi selama 10 menit pada 13.000 rpm. Lalu ambil pelet DNA pada bagian dasar tube dan membuang bagian supernatan. Ditambahkan 600 µL Etanol 70 % pada suhu ruang dan campur pelet DNA dengan membolak-balikkan tube beberapa kali. Selanjutnya disentrifugasi selama 10 menit pada 13.000 rpm. Secara hati-hati supernatannya dikeluarkan dengan mikropipet dan jangan sampai pelet DNA terambil. Tube dibalikkan di atas kertas tissue (penyerap) dan dikeringkan udarakan selama 10 menit. Ditambahkan 100 µl DNA *Rehydration Solution*, dan rehidrasi DNA dengan menginkubasikan tube dalam *waterbath* selama 1 jam pada suhu 65°C. Guna menyakinkan pada isolat DNA dapat dilakukan elektroforesis, jika ekspresi gen muncul kemudian isolat DNA dapat disimpan pada freezer pada suhu -20 °C untuk kemudian siap digunakan pada tahap berikutnya.

3. Amplifikasi Sekuen DNA WSSV dengan PCR

Untuk melihat ada tidaknya sekuen DNA WSSV yang terkandung dari hasil pengerjaan isolasi DNA udang, maka isolat-isolat DNA udang tersebut digunakan sebagai *template* (cetakan) untuk sekuen DNA WSSV dalam proses amplifikasi dengan PCR. Tahapan pengerjaan proses amplifikasi yaitu pertama membuat

suatu formulasi komponen untuk reaksi PCR DNA WSSV dengan campuran reaksi untuk volume akhir total larutan 25 μ L. Komponen terdiri dari 12,5 μ L Kit Promega Go Taq[®] Master Mix (konsentrasi akhir 2 U/ μ L), 2,5 μ L isolat DNA, 1 μ L primer 146-F1/F2 (konsentrasi 50 pmol/50 μ L = 1 μ M), 1 μ L primer 146-R1/F2 (konsentrasi 1 μ M), dan 8 μ L *Nuclease Free Water* (NFW) dicampur pada mikrotube eppendorf 0,5 mL. Kemudian semua komponen PCR mix disentrifugasi pada “*Minispin Eppendorf*” pada kecepatan 10.000 rpm.

Pengaturan mesin PCR (*thermocycler*) tipe “*Mastercycler Personal*” dengan tahapan pra-denaturasi pada suhu 94 °C selama 2 menit, denaturasi pada suhu 94 °C selama 1 menit, annealing pada suhu 55 °C selama 1 menit, ekstensi pada suhu 72 °C selama 2 menit dengan jumlah siklus 39. Ekstensi akhir pada suhu 72 °C selama 5 menit dan “*end hold*” pada suhu 4 °C. Setelah proses PCR selesai produk PCR dapat dielektroforesis atau disimpan pada suhu -20 °C.

4. Elektroforesis

Untuk memvisualisasikan DNA WSSV dari udang yang telah diisolasi dan telah diamplifikasi dengan *thermocycler*, kemudian dilanjutkan dengan *running* elektroforesis gel agarose menurut Sambrook *et al.*, (1989). Produk PCR, Marker 100 bp, kontrol positif dan kontrol negatif WSSV diambil masing-masing sebanyak 2,5 μ L, kemudian pada masing-masing sampel ditambahkan 2 μ L *Loading dye* dan dicampurkan homogen di atas parafilm. Produk-produk hasil PCR yang berisi sampel jaringan udang tersebut disuntikkan ke dalam sumur gel agarose 1% dengan TBE 0,5 x pada voltage 75 V, 65 mA selama 90 menit. Setelah selesai gel direndam larutan EtBr selama 20 menit dan dipindahkan untuk dicuci pada aqua steril selama 10 menit. Kemudian dokumentasikan hasil elektroforesis dengan kamera digital pada UV-transilluminator.

HASIL DAN PEMBAHASAN

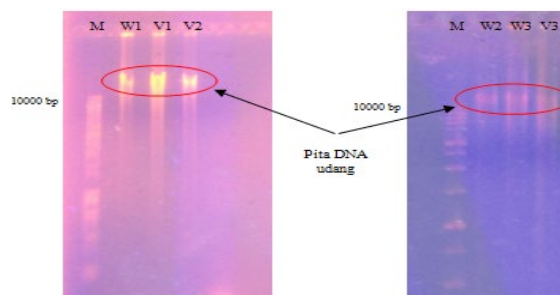
Pengamatan secara histologi morfologis dengan mengamati organ-organ yang menjadi target utama serangan WSSV yaitu seluruh karapas (Lo *et al.*, 1998; Zaenal *et al.*, 2007), sel insang, hepatopankreas dan usus (Muliani, 2007), maka tidak ditemukan adanya indikasi telah terserang WSSV yang ditandai dengan munculnya bintik putih pada organ target dan perubahan warna tubuh kemerahan (Beaumont, 2003; Montet, 2009)

Isolasi DNA Udang

Hasil isolasi menunjukkan hasil yang positif adanya pita fragmen DNA genom pada semua sampel udang windu (W1, W2, W3) dengan ditandai adanya pita tebal pada gel yang berada pada posisi di atas 10000 bp (Gambar 2).

Amplifikasi Sekuen DNA WSSV

Amplifikasi sekuen DNA WSSV dengan PCR dilakukan sebagaimana juga pendapat Muliani *et al.*, (2007) dan Sukenda *et al.*, (2009), meskipun secara morfologi tidak ditemukan adanya tanda-tanda infeksi

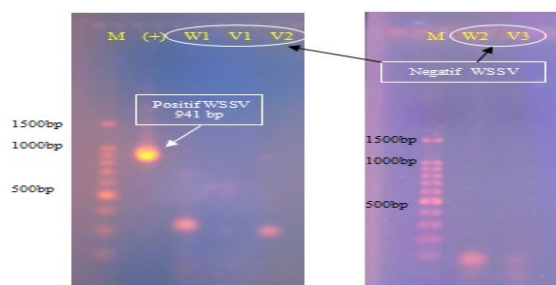


Gambar 2. Hasil elektroforesis DNA genom sampel udang windu dan udang vaname

Keterangan: M: Marker 1 kb; W1: Isolat DNA genom benur udang windu (PL) asal Cantigi; W2: Isolat DNA genom benur udang windu (PL) asal Karangsong; W3: Isolat DNA genom udang windu dewasa asal Karangsong

WSSV pada semua sampel udang yang diamati, tetapi terdapat kemungkinan setelah dianalisis dengan PCR ternyata positif terinfeksi WSSV. Proses amplifikasi dilakukan dengan dua langkah menggunakan primer pms 146-F2 dan primer pms 146-R2 setelah pada langkah pertama menggunakan primer pms 146-F1 dan pms 146-R1 tidak keluar pita DNA genom WSSV.

Hasil analisa menunjukkan bahwa kontrol positif (+) mengandung sekuen DNA WSSV. Hal ini karena primer pms 146-F2 dan pms 146-R2 mengekspresikan posisi pita DNA WSSV berada pada 941 bp (Chang *et al.*, 2002). Sedangkan hasil analisis terhadap udang sampel menunjukkan hasil negatif pada semua udang windu (W1 dan W2). Sebab walaupun menunjukkan adanya pita (W1, W2, V3), tetapi jika berada pada posisi di luar target yang diharapkan, maka pita tersebut bukan merupakan pita DNA WSSV (Lo *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 2002).



Gambar 3. Hasil elektroforesis pita DNA udang dengan primer WSSV

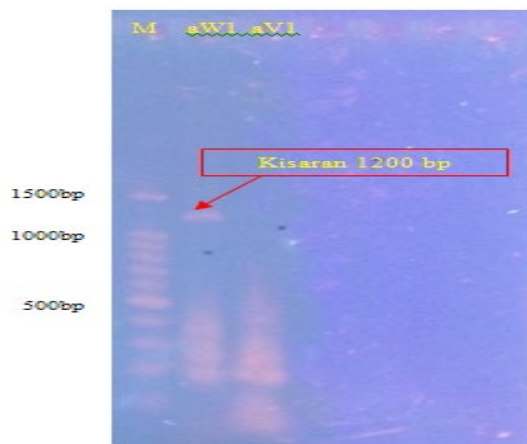
Keterangan: M: Marker 100 bp; (+): Kontrol positif; W1: Isolat DNA genom benur udang windu (PL) asal Cantigi (-); W2: Isolat DNA genom benur udang windu (PL) asal Karangsong (-); W3: Isolat DNA genom udang windu dewasa asal Karangsong (-)

Isolat DNA udang yang negatif (resisten) terhadap WSSV selanjutnya digunakan sebagai kandidat untuk mengkloni sekuen gen penyandi anti WSSV.

Isolasi dan Amplifikasi Gen Penyandi Anti WSSV pada Udang Windu (*P. monodon*)

Isolasi gen penyandi anti WSSV dengan menggunakan DNA udang windu sebagai templat. Gen penyandi anti WSSV diisolasi dengan menggunakan primer spesifik yaitu PmAV-F 5'- tag tgc atg cat atg ggt cat aca atc cta-3' dan PmAV-R 5'-ctg tct cga gct atg tgt cct gct ttc aca-3' (Parenrengi *et al.*, 2009)

menunjukkan adanya pita sekuen gen penyandi anti WSSV pada DNA udang windu (aW1) yang berada pada posisi antara 1000bp-1500bp (Gambar 4).

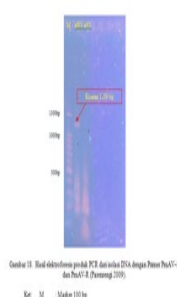


Gambar 4. Hasil elektroforesis produk PCR dari isolasi

DNA dengan Primer PmAV-F dan PmAV-R
Keterangan: M: Marker 100 bp; aW1: anti WSSV pada DNA udang windu (*P. monodon*)

GGGGAATGCACACTGCTGATCGCAGTG-TAGCACGACACATCATGGATATGGTAAAT-GAGTCCCAGCGCATGACGGCACAGTTCTCT-GAGGAGCCACCATCTGGTTGTTGAGAGATG-GAGGTGCAATGGTACCACAAGGGAACACCT-GTCCGCATGAGAGTTCCGTCCTCCACAGCCAAA-GACCCTCGTGGTTCTCGTCACTCCCCCGATC-CAGTAGTCTCTGTTTACACCCACTACACAAAG-CAGTTGCTACATTTAGCTATATTTTACTTTTGTGTCTTAAAAATTTGTAATAGACTGTGCTCATGCT-GAGATTAGTTCTTAATATCATATATGCAAAAT-GTTCACATCAAATTGGATAAAAAGTTACATGGT-TCAAACAAAATCCTATAAACCTAAGAAGAAGCT-TACCTTGGTAAGTAATGTACTCAACGATATCAGTAA-GGAGATTAGCGTCATCCAGCTTGAGAAAGTCTC-CATTTATAAGGTTACAGTACTCTCGCATGTCATAC-CAGCTTCCATCTGTCTGGTGATCGACAAACAAA-CAGCGATCCGCAATGGCAGTATAGGGGCTATAG-CAGACTGAAATATTAATTTAAAATTTACCAATA-ATTAT

windu (aW1) yang berada pada posisi antara 1000bp-1500bp (Gambar 18).



Gambar 5. Hasil Blast-N sekuen anti WSSV sampel (aW1) - PmAV-R

Hasil sekuensing gen penyandi anti WSSV pada DNA udang windu sampel (aW1) dengan primer PmAV-R menunjukkan jumlah nukleotida sebesar 619 bp, walaupun panjang pita pada gel berada berkisar 1200 bp.

Hasil Blast-N terhadap sekuen nukleotida gen penyandi anti WSSV pada *P. monodon* sampel (aW1) dengan menggunakan primer PmAV-R menunjukkan bahwa sekuen tersebut dapat disejajarkan dengan *Penaeus monodon* AV gene, complete cds (no. Akses DQ641258.1) dengan pensejajaran (*alignment*) sebesar 94%, *Penaeus monodon* PMAV (PmAV) mRNA, complete cds (no. Akses AY3202750.1) dengan pensejajaran sebesar 62%. (Gambar 5).

Hasil sekuen gen penyandi anti WSSV dengan primer PmAV-R jika disejajarkan dengan sekuen nukleotida antiviral *Penaeus monodon* PMAV (PmAV) mRNA, complete cds (no. Akses AY320750.1), maka secara utuh akan terlihat sekuen gen penyandi anti WSSV berada pada posisi basa nukleotida ke 94 - 477 dari sekuen *Penaeus monodon* PMAV (PmAV) mRNA, complete cds no. Akses AY320750.1 atau persentase homolog sebesar 74% seperti yang ditandai warna hijau pada urutan sekuen di bawah ini:

```
>gi34576190gb|AY320750.1|Penaeus monodon PMAV (PmAV) mRNA, complete cds
1  atggttcata caatctagt ttctcttcc ctggtgttg ttggtctggtc tgtggaaca
61  tcatacaga aaagtgcac ttgttccag gctgtctgtc atagccctta tactgccatt
121 gggagtcgct gttgtttgt cgtaccacg acagatgaa gctgtgtatg catgcgagag
181 tactgtaacc ttataaatg agactttctc aagctggtg acgctaactt ccttactgat
241 atcgttgagt acattactta ccaagtgggt gtgaacagag actactggtt cggggggagt
301 gaacagaaac acgaggtctt ttggtgtgtg acggaacgaa ctctctatgc gacaggtgtt
361 ccttctgtgt accattgcac ctccatctct caacaacag atgtgtgtgtc ctacagagac
421 tgtgtcgtca tgcgtgtgga ctcatcttcc catatccatg atgtgtgtgt ctacacttct
481 cgtgtgtgca ttgtgaaag caggacacat taa
```

Ket : Biru = sekuen antiviral *P. monodon* PMAV (PmAV) mRNA, complete cds
Hijau = Alignment antara sekuen sampel dengan sekuen antiviral *P. monodon* PMAV (PmAV) mRNA, complete cds

Gambar 6. Pensejajaran sekuen aW1-PmAV-R dengan sekuen di GenBank no. Akses AY320750.1

Hasil Blast-N sekuen gen penyandi anti WSSV (aW1) tersebut baik dengan primer PmAV *forward* maupun PmAV *Reverse*, terlihat bahwa sampel udang windu (*P. Monodon*) yang diambil di daerah Indramayu memiliki kesejajaran dengan sekuen nukleotida *Penaeus monodon* AV gene, no. Akses DQ641258.1 maupun sekuen nukleotida *Penaeus monodon* PMAV (PmAV) mRNA, complete cds no. Akses AY320750.1 (Gambar 6) atau sekuen asam amino pada udang *P. monodon* (PmAV) no. Akses AAQ75589.1

Lektin tipe-c sebagai Domain Fungsional Gen Penyandi Anti WSSV

Analisis untuk mengetahui domain fungsional sekuen gen penyandi anti WSSV menunjukkan bahwa potensi sekuen gen penyandi anti WSSV pada *P. monodon* di daerah Indramayu memiliki kesamaan dengan susunan nukleotida lektin tipe-c berdasarkan data program PROSITE (Gambar 7).

Berdasarkan hasil analisis domain fungsional seperti terlihat bahwa posisi lektin tipe-c pada sekuen asam amino anti WSSV (PmAV) dengan jumlah 170 asam amino berada pada posisi sekuen *isoleucine* (I)₄₀ – *glutamic acid* (E)₁₆₆ atau memiliki panjang 126 asam amino. Hal itu berarti domain fungsional lektin

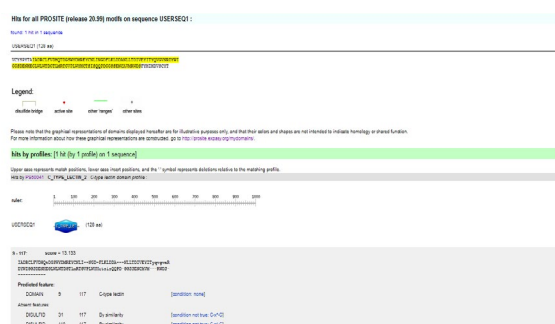


Gambar 21. Hasil Blast-N sekuen anti WSSV sampel (aW1) - PmAV-R

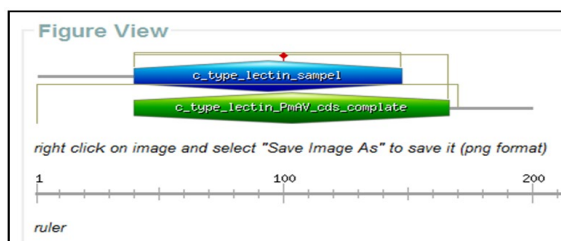
tipe-c sekuen asam amino gen penyandi anti WSSV sampel (aW1) berada pada *isoleucine* (I)₄₀ – *serine* (S)₁₄₈ pada sekuen anti WSSV (PmAV) (Gambar 8).



Gambar 7. Hasil analisis domain fungsional sekuen asam amino gen penyandi anti WSSV pada udang *P. monodon* (PmAV) no. Akses AAQ75589.1 dengan program data PROSITE



Gambar 8. Hasil analisis domain fungsional sekuen asam amino gen penyandi anti WSSV pada udang windu sampel (aW1) dengan program data PROSITE



Gambar 9. Perbandingan posisi domain fungsional lektin tipe-c antara gen penyandi anti WSSV sampel dengan PMAV complete cds no. Akses AAQ75589.1

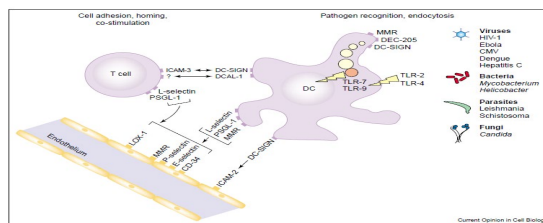
Lektin tipe-c pada sekuen PmAV memiliki panjang 126 asam amino dengan dua ikatan disulfida (ditandai huruf c kecil berwarna hijau pada c₆₂, c₁₆₅), empat *cysteine* (ditandai huruf kapital C berwarna merah pada C₄₄, C₁₂₆, C₁₄₁, C₁₅₇), dan lima *tryptophan* (ditandai huruf kapital W berwarna biru pada W₅₄, W₉₆, W₁₀₈, W₁₁₀, W₁₂₃) sebelum *cysteine* kedua (ditandai huruf kapital C berwarna merah pada C₁₂₆) dengan urutan sebagai berikut:

40 IADRCFLVDH QTDGSDWDMREYNLNGDF LKLDNALLTDIVEYITQV GVNRDYWGIG
100 SDENHEGLWL WTDGLTMRIG VPLWYHCTSI SQQFDGGSS NCAVMRWDSF YHHDVSCYT
160 SRSVI: E

Lektin tipe-c merupakan jenis protein yang memainkan peran penting dalam sistem kekebalan tubuh bawaan non-spesifik invertebrata dan diyakini sangat efisien mengurangi serangan patogen dari jenis

virus dan bakteri (Wei *et al.*, 2012). Lektin tipe-c terbagi menjadi tiga famili lektin yaitu *selectins*, *collectins*, dan *endocytic lectins* (Sharon and Lis 2004).

Menurut Cambi dan Figdor (2003), *c-type lectin like receptors* memiliki dua fungsi sebagai pengenalan patogen dan adhesi sel. Terjadi mekanisme interaksi antara *lectin like receptors* (LLRs) dan *toll like receptors* (TLRs) yang berbagi fungsinya sebagai pengenalan dan reseptor patogen tetapi masing-masing memiliki hasil yang berbeda (Gambar 10).

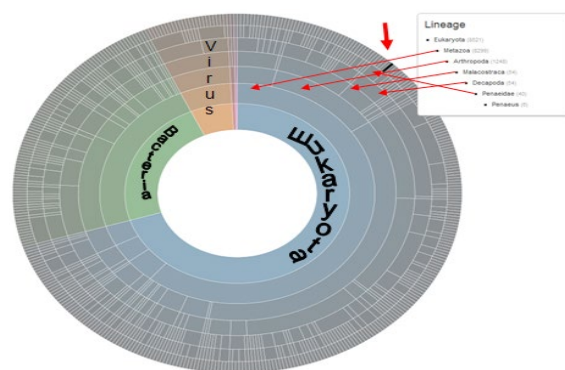


Gambar 10. Fungsi dan mekanisme lektin tipe-c dalam merespon patogen (Sumber: Cambi and Figdor, 2003)

Beberapa hasil riset molekuler melaporkan bahwa lektin tipe-c diketahui dapat mengurangi serangan virus WSSV yang dialami udang *P. monodon* (Luo *et al.*, 2003), udang *L. vannamei* (Ma *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2012) dan jenis kepiting *Portunus trituberculatus* (Kong *et al.*, 2008). Hasil riset tentang pemberian lektin juga telah diujikan sebagai imunostimulan pada teripang *Stichopus japonicus* (Chuannan *et al.*, 2005) termasuk pada manusia seperti *mistletoe lektin I* (*Viscum album* agglutinin 1 = VAA-I) (Samtleben *et al.*, 1999).

Jika imunostimulan sebagaimana pendapat Anderson (2004) mampu meningkatkan respon imunitas ikan dan udang baik seluler maupun humoral, maka lektin tipe-c sebagai pertahanan humoral dapat diberikan melalui cara imunostimulan dengan menambahkannya pada pakan atau media budidaya. Lektin tipe-c dapat masuk ke dalam sel melalui proses endositosis dan kemudian meningkatkan sistem imun dan menetralkan patogen.

Grafik Taksonomi Superfamili lektin tipe-c sekuen gen penyandi anti WSSV yang dianalisis dengan program data CATH menunjukkan beberapa organisme yang memiliki kedekatan domain dengan jenis protein lektin tipe-c (Gambar 11).



Gambar 11. Posisi sekuen gen penyandi *P. monodon* dalam taksonomi superfamili lektin tipe-c berdasarkan grafik dari program data CATH

Hasil analisis menunjukkan bahwa terdapat sekitar 728 dari organisme bakteri, virus dan kelompok eukaryota dengan rincian khusus untuk kelompok udang *Penaeidae* diantaranya yaitu *L. vannamei* (9 gen), *P. monodon* (4 gen), dan *Fenneropenaeus mergulensis* (2 gen). Hal ini sesuai dengan pendapat Wei *et al.* (2012) yang menyatakan bahwa lektin tipe-c pada *L. vannamei* dapat disejajarkan dengan lektin tipe-c pada jenis invertebrata lain. Bahkan sebuah analisis filogenetik PtLP menunjukkan bahwa gen PmAV pada *P. monodon* berada dalam kelompok besar bersama dengan *c-type lectin like-domain* (CTLD) pada kepiting *Portunus trituberculatus*, dan semua jenis lektin tipe-c dari berbagai udang seperti *P. monodon*, *L. vannamei*, *P. semisulcatus*, *Fenneropenaeus chinensis* (Kong *et al.*, 2008).

SIMPULAN

Simpulan dari penelitian ini adalah bahwa sekuen gen penyandi anti WSSV pada DNA udang windu asal Kabupaten Indramayu bisa dikatakan homolog dengan sekuen gen *Penaeus monodon* AV gene, complete cds (no. Akses DQ641258.1) dan *Penaeus monodon* PMAV (PmAV) mRNA, complete cds (no. Akses AY3202750.1) dengan domain fungsional lektin tipe-c.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Pusat Pendidikan dan Kelautan di Badan Pengembangan SDM Kelautan dan Perikanan atas kesempatan beasiswa bagi penulis serta kepada Bapak Prof. H. Yayat Dhahiyat, Ph.D., Ir. Ibnu Dwi Buwono, M.Si., dan Drs. Walim Lili, M.Si. sebagai dosen penguji.

DAFTAR PUSTAKA

Anderson, D.P. 2004. Immunostimulants, Vaccines, and Environmental Stressors in Aquaculture: NBT Assays to show Neutrophil Activity by these Immunomodulators. In: Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto López, M.G., Villarreal, D., Scholz, U. y González, M. 2004. Avances en Nutrición Acuicola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México.

Arts, J.A.J. 2006. Immune defence of White Spot Syndrome Virus infected shrimp, *Penaeus monodon*. Thesis Wageningen Universiteit - with references - with summary in Dutch. 134p.

Beaumont, A.R. & Hoare, K. 2003. *Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquaculture*. School of Ocean Sciences. University of Wales, Bangor, UK: Blackwell Science Ltd, a Blackwell Publishing Company.

Calder, P.C. 2006. *Branched-Chain Amino Acids and Immunity*. Published in a supplement to The Journal of Nutrition. Presented at the conference 'Symposium on Branched-Chain Amino Acids,' held May 23–24, 2005 in Versailles, France. The conference was sponsored by Ajinomoto USA, Inc. Downloaded from jn.nutrition.org by guest on March 14, 2013.

Cambi, A. & Figdor, C.G. 2003. Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. Cell-To-Cell Contact and Extracellular Matrix. Current Opinion in Cell Biology, 15:539–546.

Chang, Y.S., Lo, C.F., Peng, S.E., Liu, K.F., Wang, C.H. & Kou, G.H. 2002. White spot syndrome virus (WSSV) PCR-positive *Artemia* cysts yield PCR-negative nauplii that fail to transmit WSSV when fed to shrimp postlarvae. Dis Aquat Org. 49: 1-10.

Chotigeat, W., Tongsupa, S., Supamataya, K. & Phongdara, A. 2004. Effect of Fucoidan on Disease Resistance of Black Tiger Shrimp. Elsevier B.V. All rights reserved. Aquaculture 233 p 23–30.

Chuannan, X., Wei, L., Xuefang, B. & Yuguang, D. 2005. Application of Lectins as Immunostimulants in Mariculture of Sea Cucumber *Stichopus Japonicus*. Available online at http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-FEED200518010.htm > 14/01/2014.

Flegel, T.W., Lightner, D.V., Lo, C.F. & Owens, L. 2008. Shrimp disease control: past, present and future, pp. 355-378. In Bondad-Reantaso, M.G., Mohan, C.V., Crumlish, M. and Subasinghe, R.P. (eds.). Diseases in Asian Aquaculture VI. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.

Jones, D.T. 1999. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices (PSIPRED). Journal of Molecular Biology 292: 195-202.

Kementerian Kelautan dan Perikanan (KKP). 2013. Produksi Udang. Melalui http://www.kkp.go.id/index.php/mobile/arsip/c/8499/Produksi-Udang-Akan-Didorong-30-Persen/?category_id=58 > 13/02/13.

Kong, H.J., Park, E.M., Nam, B.H., Kim, Y.O., Kim, W.J., Park, H.J., Lee, C.H. & Lee, S.J. 2008. A C-type lectin like-domain (CTLD)-containing protein (PtLP) from the swimming crab *Portunus trituberculatus*. Short Communication. Fish & Shellfish Immunology 25: 311-314.

- Lo, C.F., Chang, Y.S., Cheng, C.T. & Kou, G.H. 1998. PCR monitoring of cultured shrimp for white spot syndrome virus (WSSV) infection in growth ponds. In: Flegel, T.W. (Ed.), *Advances in shrimp biotechnology*, BIOTEC, The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, pp. 281–286.
- Luo, T., Zhang, X., Shao, Z. & Xu, X. 2003. PmAV, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon*. *FEBS Lett.* 11; 551 (1-3): 53-7.
- Ma, T.H.T., Tiu, S.H.K., He, J.G. & Chan, S.M. 2007. Molecular cloning of a C-type lectin (LvLT) from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Early gene down-regulation after WSSV infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 23: 430-437.
- Montet, D & Ray, R.C. 2009. *Aquaculture microbiology and biotechnology Volume I*. 639.3 --dc22. Published by Science Publishers, Enfield, NH, USA. 277p.
- Muliani, B., Tampangallo, R. & Atmomarsono, M. 2007. Pemantauan Penyakit White Spot Syndrome Virus (WSSV) Pada Udang Windu *Penaeus monodon*. *Aquacultura Indonesiana*. Maros SulSel: Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau (BRPBAP). 8 (2): 81–88.
- Parenrengi, A., Alimuddin., Sukenda, Sumantadinata, K. & Tenriulo, A. 2009. Karakteristik Sekuen cDNA Pengkode Gen Anti Virus dari Udang Windu, *Penaeus monodon*. *Jurnal Riset Akuakultur*, 4: 1-13.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning*. Second edition. Cold Spring Harbor Lab. Press. New York. USA. P 568-600.
- Samtleben, R., Hajto, T.K.H. & Wagner, H. 1999. Mistletoe Lectins As Immunostimulants (Chemistry, Pharmacology And Clinic). *Immunomodulatory Agents from Plants*. edited by H. Wagner © 1999 Birkhauser Verlag Basel/ Switzerland. Page 223-241.
- Sharon, N., & Lis, H. 2004. Review: History of Lectins: From Hemagglutinins to Biological Recognition Molecules. *Glycobiology*. 14 (11): 53-62.
- Sukenda, S.H., Dwinanti. & Yuhana, M. 2009. Keberadaan White Spot Syndrome Virus (Wssv), Taura Syndrome Virus (Tsv) dan Infectious Hypodermal Haematopoietic Necrosis Virus (Ihhnv) Di Tambak Intensif Udang Vaname *Litopenaeus vannamei* Di Bakauheni, Lampung Selatan. *Jurnal akuakultur Indonesia* 8 (2): 1-8.
- Wei, X., Liu, X., Yang, J., Fang, J., Qiao, H., Zhang, Y. & Yang, J. 2012. Two C-type lectins from shrimp *Litopenaeus vannamei* that might be involved in immune response against bacteria and virus. *Fish & Shellfish Immunology* 32: 132-140.
- Yeh, S.P., Chen, Y.N., Hsieh, S.L., Cheng, W. & Liu, C.H. 2009. Immune response of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after a concurrent infection with white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. *Fish & Shellfish Immunology* 26: 582-588.
- Zaenal. A., Adiwidjaya, D., Komarudin, U., Nur, A. Susanto, A. 2007. Penerapan Best Management Practices (BMP) pada Budidaya Udang Windu (*Penaeus monodon* Fabricus) Intensif. Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau Jepara. Jepara. 77 halaman.